

ヒトアデノウイルス 12 型のトランスフォーム遺伝子 より転写される mRNA の解析

澤 田 幸 治

札幌医科大学がん研究所分子生物学部門 (主任 藤永 蕙 教授)

Analysis of mRNA's Transcribed from the Transforming Genes of Human Adenovirus Type 12

Yukiharu SAWADA

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute,
Sapporo Medical College
(Chief : Prof. K. Fujinaga)

Adenovirus type 12 mRNA's transcribed from the transforming region in cells transformed by the *EcoRI*-C (leftmost 16.2%), *HindIII*-G (leftmost 6.8%) and *AccI*-H (leftmost 4.7%) fragments of adenovirus type 12 DNA, and in cells lytically infected with adenovirus type 12 were analyzed and mapped on viral DNA by the nuclease S1 mapping and DBM paper blot hybridization techniques. mRNA's were transcribed from the r strand in the transforming region which corresponds to the viral early genes E1 A and E1 B. In CY1-1 cells transformed by the *EcoRI*-C fragment three E1 A mRNA's and one E1 B mRNA were found, all having spliced structures. GY1-1 cells transformed by the *HindIII*-G fragment contained three E1 A mRNA's common to GY1-1 cells and two additional E1 A transcripts which should be the 3' portions of chimeric mRNA's of cellular-viral and viral-viral sequences. The GY1-1 cells also contained a transcript from the leftmost part of the E1 B gene as the 5' portion of chimeric mRNA species. HY1-5 cells transformed by the *AccI*-H fragment, which carries only the E1 A gene, contained three E1 A mRNA's identical to those found in the CY1-1 and GY1-1 cells. These results indicate that the E1 A gene function alone can produce incomplete transformation phenotypes, and that the E1 B gene function necessary for complete transformation is coded for in the leftmost part of the E1 B gene transcribed into GY1-1 specific chimeric mRNA's. The chimeric mRNA species, which were not found in CY1-1 cells nor in cells lytically infected with adenovirus type 12, also suggest the presence of tandemly integrated viral DNA as their transcriptional template in GY1-1 cells. The coding regions for and the sizes of candidate viral proteins responsible for cell transformation were estimated on the basis of the above results and the nucleotide sequence of the E1 A and E1 B genes of adenovirus type 12 DNA determined recently.

(Received December 17, 1981 and accepted January 18, 1982)

1 緒 言

ヒトアデノウイルスは齧歯動物由来の培養細胞をトランスフォームすることができる。¹⁾ このヒトアデノウイルスによる細胞のトランスフォーメーションにはウイルスゲノムの全体は必要ではなく、左端 7~8% の DNA 断片で充分であることが、ヒトアデノウイルス DNA の制限酵素断片を用いた細胞のトランスフォー

メーションの実験より明らかとなり、ヒトアデノウイルス 12 型 (Ad 12) DNA *HindIII*-G 断片 (左端 6.8%)²⁾, Ad7 DNA *HindIII*-I・J 断片 (左端 7.8%)³⁾ および Ad2 および Ad5 DNA *HindIII*-G 断片 (左端 8.0%)⁴⁾ によるトランスフォーム細胞株が樹立されている。さらに Ad12 DNA *AccI*-H 断片 (左端 4.7%)⁵⁾, Ad7 DNA *BglII*-H 断片 (左端 4.5%)⁶⁾ および Ad5 DNA *HpaI*-E 断片 (左端 4.3%)⁷⁾ にも不完全ながらト

ランスフォーム能が認められた。

一方、ヒトアデノウイルスの増殖感染初期には、ウイルス DNA 上の少なくとも四つの領域が転写される。^{8,9)} そのうちウイルス DNA の左端 (0~11.5%) に位置する E1 領域が上記のトランスフォーメーション能の全てを含んでいる。この領域はそれぞれ別個の転写のプロモーターをもつ二つの領域 E1 A (0~4.5%) と E1 B (4.5~11.5%) に分けられる。¹⁰⁾ つまり E1 A 領域に含まれる遺伝情報は細胞を不完全ながらトランスフォームする能力をもち、E1 B 領域の左端部分に含まれる遺伝情報が細胞の完全なトランスフォーメーションに必要であると考えられている。⁹⁾ またヒトアデノウイルス 5 型の宿主域欠損変異株の解析から E1 A 領域の遺伝子産物が他の初期遺伝子の発現の制御に関与している可能性が指摘されている。^{11,12)}

ヒトアデノウイルス 2 型および 5 型については、この初期領域 E1 から転写される mRNA の構造と位置づけが nuclease S1 mapping 法を用いて調べられており、^{11,13,14)} E1 A 領域に少なくとも 2 種、E1 B 領域に 1 種、それぞれスプライス構造をもつ mRNA が同定されている。電子顕微鏡による観察ではさらに数種の mRNA がこの領域から合成されていることが示され、¹⁵⁾ E1 A, E1 B 領域とも複雑な遺伝子構造をもっていることが推定される。

我々はヒトアデノウイルス 12 型 DNA *Hind*III-G および *Eco*RI-C 断片により誘発した完全トランスフォームラット細胞 (GY1-1 および CY1-1) 並びに感染ヒト細胞中において E1 領域から転写される mRNA 種を同定し、鋳型 DNA 上に位置づけた¹⁶⁾ が、本論文ではこれらに加えて *Acc*I-H 断片により誘発した不完全トランスフォームラット細胞中において転写される mRNA 種を同定して、ヒトアデノウイルスによるトランスフォーメーションにかかわる遺伝情報を mRNA のレベルで明らかにした。これらの結果と、最近決定されたヒトアデノウイルス 12 型 DNA の E1 領域の塩基配列^{17,18)} をもとに、各遺伝子産物を推定することが可能になった。

2 実験材料と方法

2.1 培養細胞株とウイルス

研究対象として取り上げたトランスフォーム細胞株は、Fischer rat embryo 由来のラット正常細胞株 3Y1 を Ad12 DNA *Eco*RI-C 断片 (左端 16.2%) でトランスフォームした CY1-1,⁹⁾ *Hind*III-G 断片 (左端 6.8%) でトランスフォームした GY1-1²⁾ および *Acc*I-H 断片 (左端 4.7%) でトランスフォームした HY1-5⁵⁾ である (Fig. 1 参照)。これらは 10% 牛胎児血清添加の低 Ca^{2+} (0.1 mM) Eagle's minimum essential medium (MEM) を用いて培養した。ヒト KBIII 細胞は 10% 仔牛血清添加 Eagle's MEM で単層培養し、ヒトアデノウイルス 12 型 (Huie 株) はヒト KBIII 細胞に感染し増殖させた。

2.2 ウイルス DNA 断片の調製と RI 標識

ウイルス DNA は塩化セシウム密度勾配遠心により精製したウイルス粒子より抽出した。^{20,21)} ウイルス DNA を各種制限酵素で切断後、生じた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、ゲルより抽出・精製して用いた。標識ウイルスは 100 $\mu\text{Ci/ml}$ の [^{32}P] 正リン酸を含む培地中に培養した感染ヒト KB III 細胞より調製した。高比放射活性の ^{32}P 標識 DNA 断片の調製には未標識 DNA 断片を nick translation 法^{22,23)} により試験管内で標識した。DNA の相補鎖は DNA をアルカリ処理後、中性アガロースゲル電気泳動により分離した。

2.3 細胞質 RNA の調製

CY1-1, GY1-1, HY1-5 および感染ヒト KB III 細胞 (Ad12 感染後 8 時間および 23 時間) を、Zieve and Penman²⁴⁾ の方法に従って 0.5% NP-40 を含む低張緩衝液で破壊し、低速遠心で核を除いた上清に sodium dodecyl sulfate (SDS, 終濃度 0.5%), disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) (終濃度 10 mM) および NaCl (終濃度 0.1 M) を加えフェノール・クロロホルム (2:1) で 3 回抽出した後、2 倍容のエタノールを加えて細胞質 RNA を沈澱させた。ポリアデニ

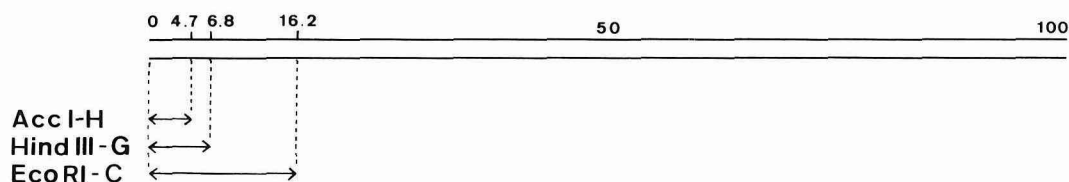


Fig. 1 Map positions of restriction fragments used for transformation. Ad12 genome is represented by horizontal lines, 0 to 100 units, and left end fragments by arrows.

ル酸をもつ RNA は oligo-dT cellulose カラムを用いて細胞質 RNA より分画した。

2.4 Nuclease S1 mapping 法

RNA と DNA の hybrid 形成反応は Casey *et al.*²⁵⁾の方法に従い, 80% formamide, 0.4 M NaCl, 0.04 M piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES; pH 6.4), 0.001 M EDTA の組成の溶媒中で約 3 時間行なった。hybrid 中の DNA 部分の検出は Berk and Sharp¹³⁾ の nuclease S1 mapping 法に従い, nuclease S1 で 1 本鎖部分を消化したのち, 2 倍容のエタノールを加えて hybrid を沈査に回収し, アルカリアガロースゲルおよび中性アガロースゲル電気泳動を行ない, autoradiography により検出した。2 次元電気泳動は, 1 次元目に中性アガロースゲル, 2 次元目にアルカリアガロースゲル電気泳動を行なった。²⁶⁾

2.5 Diazobenzoyloxymethyl (DBM) paper blot hybrid 形成法

DBM paper は Alwine *et al.*²⁷⁾の方法に従って濾紙に aminobenzoyloxymethyl 基を導入し, 使用直前に diazo 化した。

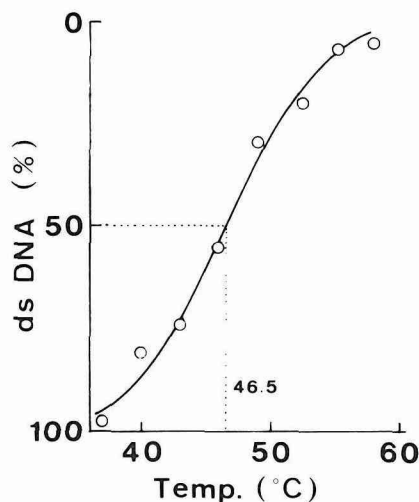


Fig. 2 Determination of T_m value for the *EcoRI*-C fragment of Ad12 DNA. Reaction mixture contained ^{32}P -labeled *EcoRI*-C fragment ($1.37 \times 10^5 \text{ cpm}$) and $400 \mu\text{g}$ of tRNA as carrier in 0.04M PIPES (pH 6.4), 0.4M NaCl, 0.001M EDTA and 80% formamide. An aliquot ($1.11 \times 10^4 \text{ cpm}$) was drawn from the mixture after 5 min incubation at a given temperature, which was chosen in sequence from lower to higher. After digestion with nuclease S1, fraction of double-stranded DNA in each aliquot was assayed.

ポリアデニル酸をもつ RNA ($20 \mu\text{g}$) を 1 M glyoxal, 50% dimethylsulfoxide, 6.7 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) からなる反応液中で 50°C , 60 分反応させて変性処理し,²⁸⁾ 1.5% アガロースゲル電気泳動した。ゲルをアルカリ処理したのち中和し, ゲル中の RNA を DBM paper に blot 法で移し固定した。次いで 50% formamide, 0.75 M NaCl, 75 mM クエン酸ナトリウム, 0.02% 牛血清アルブミン, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% ficoll および 1.5 mg/ml の変性牛胸腺 DNA より成る反応液中で ^{32}P 標識 DNA ($1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6 \text{ cpm}$) と 42°C , 20~40 時間 hybrid 形成させ, 洗浄後 autoradiography を行なった。

3 結果

3.1 Ad12 *EcoRI*-C 断片の解離温度 (T_m)

^{32}P 標識した Ad12 DNA *EcoRI*-C 断片を含む 80% formamide 緩衝液を低温側より順次, 各温度で 5 分間 incubate して一定量分取し, それぞれ nuclease S1 に対する感受性を指標に 2 本鎖 DNA 部分を定量した。Fig. 2 より T_m は 46.5°C と求められた。従って nuclease S1 mapping 法に用いる RNA-DNA hybrid の形成は, 2 本鎖 DNA が殆ど形成されない 53°C で行なった。

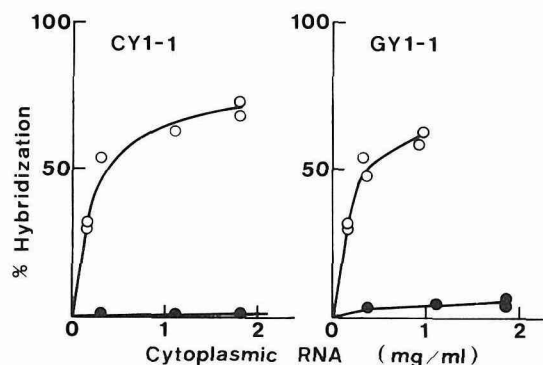


Fig. 3 Hybridization of ^3H -labeled *HindIII*-G fragment strands with CY1-1 and GY1-1 cytoplasmic RNA. Separated strands (290 to 350 cpm) of the *HindIII*-G fragment of Ad12 DNA ($5.13 \times 10^5 \text{ cpm}/\mu\text{g}$) were annealed with increasing amounts of RNA in 0.72M NaCl, 0.01M PIPES (pH 6.7), 0.001M EDTA and 0.05% SDS at 68°C for 40h, and assayed by batch elution from hydroxyapatite. Background of 2 to 6% of the input was subtracted, and maximum hybridization of 79 to 92% in the presence of 13 to $14 \mu\text{g}$ of Ad12 DNA per ml was normalized to 100%. (○) r strand; (●) 1 strand.

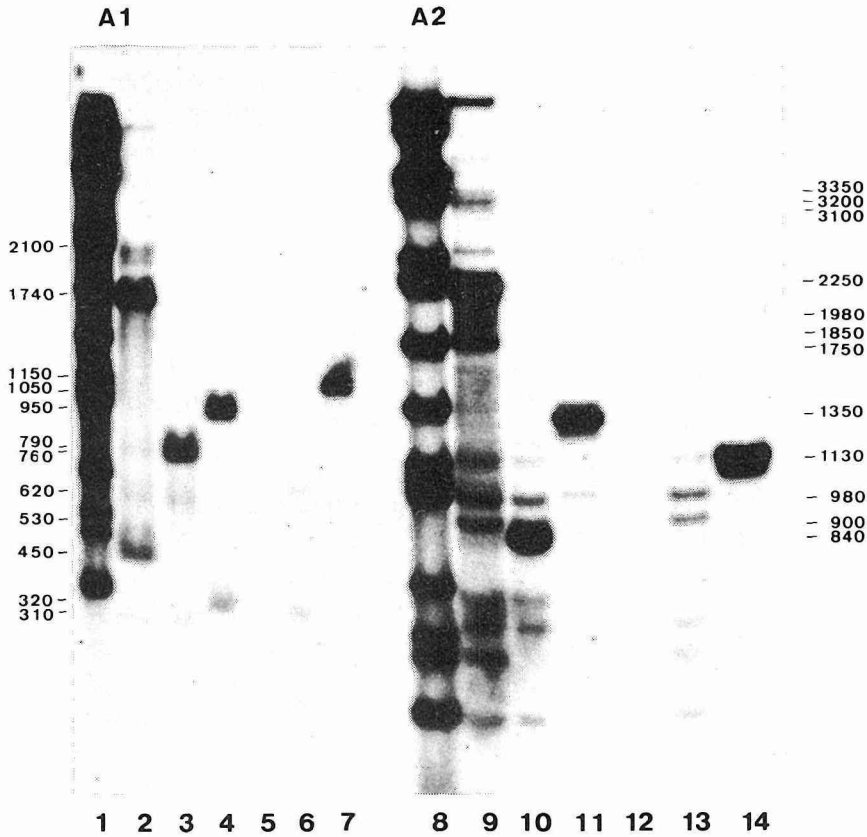
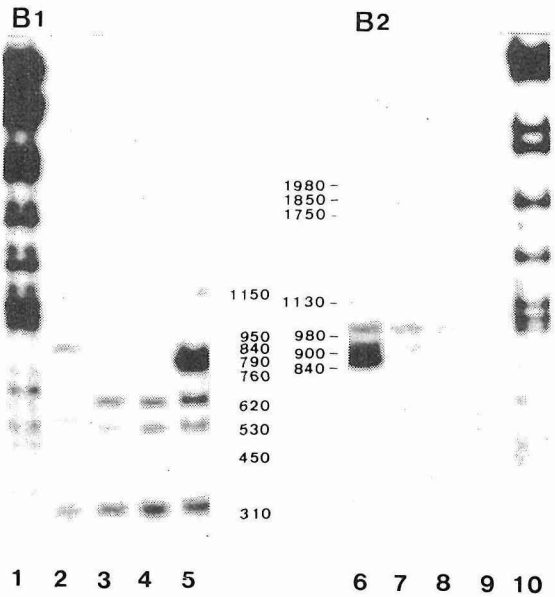
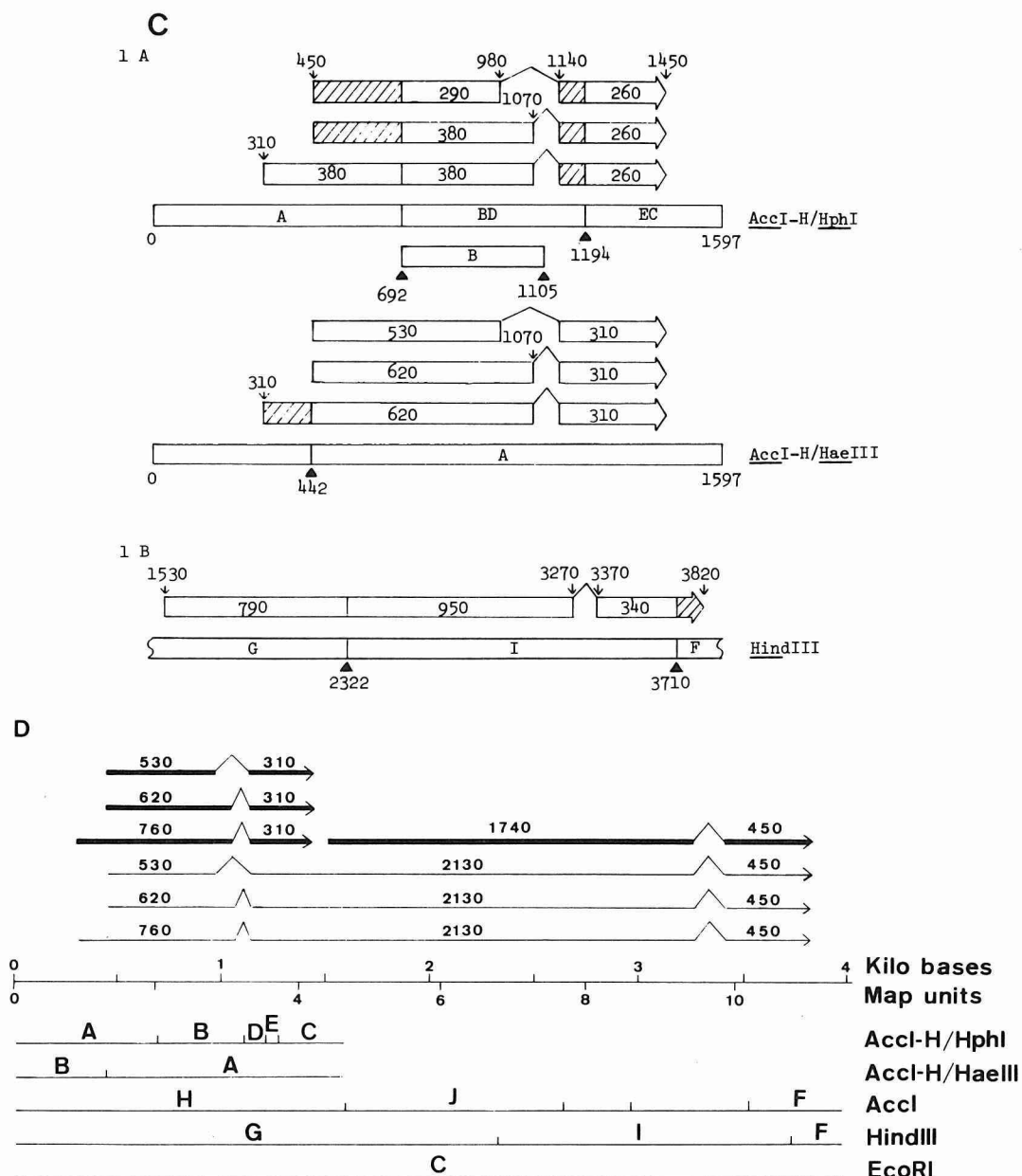


Fig. 4 Autoradiograms of nuclease S1-digested RNA-DNA hybrids of CY1-1 cytoplasmic RNA and diagrams of the deduced RNA structures. Alkaline (A1) and neutral (A2) agarose gels of nuclease S1-digested CY1-1 RNA restriction fragment hybrids. Restriction fragments used are *Eco*RI-C (lanes 2 and 9), *Hind*III-G (lanes 3 and 10), *Hind*III-I (lanes 4 and 11), *Hind*III-F (lanes 5 and 12), *Acc*I-H (lanes 6 and 13), and *Acc*I-J (lanes 7 and 14). Lanes 1 and 8 are the *Hind*III marker digests of Ad12 DNA²⁹⁾ Numbers on both sides of panel are the estimated sizes (in nucleotides) of relevant bands. Alkaline (B1) and neutral (B2) agarose gels of nuclease S1-digested hybrids



of restriction fragments and polyadenylic acid-containing cytoplasmic RNAs from CY1-1 and GY1-1 cells. Restriction fragments used are *Hind*III-G (lanes 2, 5, 6 and 9), *Acc*I-H (lanes 4 and 7), and *Acc*I-H/*Hae*III-A (lanes 3 and 8). Lanes 1 and 10 are the *Hind*III marker digests of Ad12 DNA. (C) Assignment of main bands detected in CY1-1 cells by the nuclease S1 gel procedure. Detected



portions of each cotranscript are represented by open boxes with numbers in nucleotides of corresponding band lengths. Hatched boxes represent portions not identified by the relevant restriction fragments. Caret symbols represent splicing, and the 3' end of an RNA is indicated by an arrowhead. Numbers above vertical arrows represent the assigned positions of RNA initiation, polyadenylation and splicing sites. Restriction fragments relevant to the assignments are represented below the RNA structure. (D) Diagrams of the structure of Ad12-specific RNAs in CY1-1 cytoplasm deduced from the data in (A), (B) and (C). Viral sequence present in an RNA are represented by a line above the corresponding region of the Ad12 genome map.^{29,30)} The genome map is marked off in kilobases and map units from the left end. The more abundant cytoplasmic RNAs are represented by heavy lines, and numbers above the lines represent the cotranscript lengths (in nucleotides). Restriction maps relevant to the analysis are represented below the genome map.

3.2 mRNA 合成の鋳型鎖の同定

Ad12 DNA *Hind*III-G 断片をアルカリ処理後、中性アガロースゲル電気泳動を行ない、速く泳動する fast strand と遅く泳動する slow strand に分離した。Ad12 DNA の 3'末端に標識した放射性は *Hind*III-G 断片の slow strand に見出された。従って slow strand が右方向転写鎖 (r 鎖), fast strand が左方向転写鎖 (l 鎖) であった。

^3H 標識した *Hind*III-G 断片の r 鎖と l 鎖を調製し、CY1-1 および GY1-1 細胞の細胞質 RNA との hybrid 形成を調べたところ (Fig. 3), 両細胞においてウイルス特異的 RNA は r 鎖からのみ転写されていることが示された。

3.3 CY1-1 細胞のウイルス特異的 mRNA

CY1-1 細胞の細胞質 RNA について、Fig. 4-D に示すような種々の DNA 断片を用いて nuclease S1 mapping 法により Ad12 特異的 RNA を検出した (Fig. 4-A, B)。これらの RNA の鋳型 DNA 上への位置づけは、Ad12 DNA の切断点地図^{29,30}と、hybrid 中に検出される DNA の長さとの重なりに基づいた。

*Acc*I-H 断片で検出された数本のバンドは EI A 領域から転写された mRNA に対応し、*Eco*RI-C, *Hind*III-

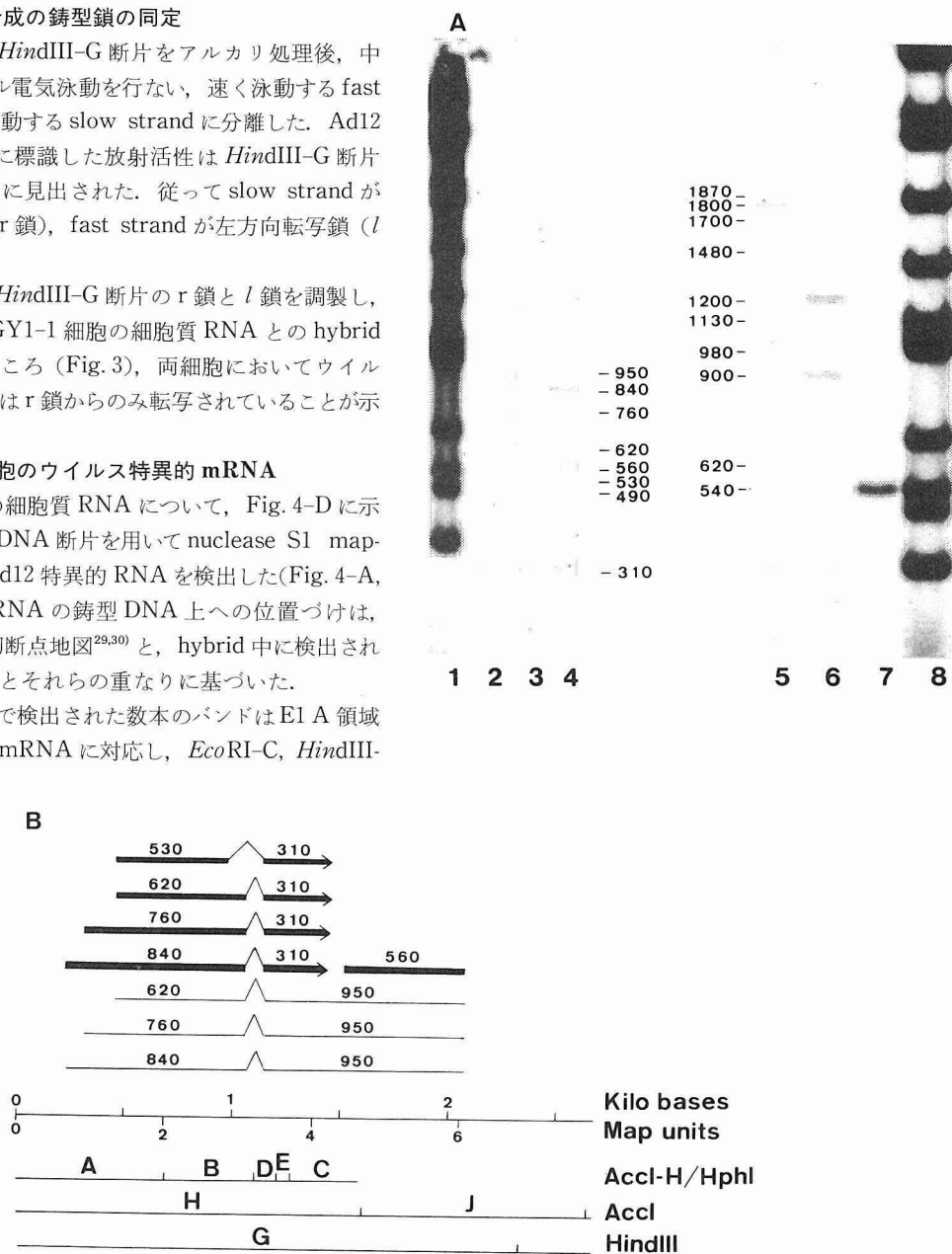


Fig. 5 Autoradiograms of nuclease S1-digested RNA-DNA hybrids of GY1-1 cytoplasmic RNA and diagrams of the deduced RNA structures. (A) Alkaline (left) and neutral (right) agarose gels of nuclease S1-digested GY1-1 RNA restriction fragment hybrids. Restriction fragments used are *Hind*III-G (lanes 4 and 5), *Acc*I-H (lanes 3 and 6), and *Acc*I-J (lanes 2 and 7). Lanes 1 and 8 are the *Hind*III marker digests of Ad12 DNA. (B) Diagrams of the structure of Ad12-specific RNAs in GY1-1 cytoplasm deduced from the data in (A) and those obtained with the *Acc*I-H/*Hae*III fragments (data not shown). Representation is as in Fig. 4.

-G 両断片によっても共通に検出された。AccI-H 断片を *Hae*III で切断して生ずる A 断片 (Fig. 4-C) では E1 A の 3 本のバンドが 2 本になった (Fig. 4-B)。バンドの濃度変化から 760 ヌクレオチドのバンドが切れて 620 ヌクレオチドのバンドに重なったと考えられたので、mRNA の 5' 端が少なくとも 2 種あり、そのうちの 1 種は *Hae*III 断点の 5' 側 140 ヌクレオチドに位置づけられた (Fig. 4-C)。

AccI-H 断片を *Hph*I で切断した数種の断片を用いた結果、Fig. 4-C に示すように、これらの E1 A mRNA には 2 種のスプライスが認められ、3' 末端およびもう 1 種の 5' 末端とともに鋳型 DNA 上に位置づけられた。

*Eco*RI-C 断片では中性ゲルで約 2,200 ヌクレオチドのバンドが濃く検出され、アルカリゲルでは 1,740 ヌクレオチドと 450 ヌクレオチドの 2 本のバンドが濃く検出された (Fig. 4-A)。これに対応するバンドは *Hind*III-G、*Hind*III-I 両断片でも見出され、Fig. 4-C

に示すように位置づけられた。他の minor species も含めて、これらの結果を Fig. 4-D にまとめた。

3.4 GY1-1 細胞のウイルス特異的 mRNA

GY1-1 細胞では AccI-H 断片によって 4 種の RNA が検出され (Fig. 5-A)、このうち小さい方の 3 種は CY1-1 細胞の E1 A の 3 種と共通であった。大きい方の 1 種は中性ゲルで約 1,200 ヌクレオチド、アルカリゲルで 840 ヌクレオチドのバンドとして検出される GY1-1 細胞に特異的な RNA であり、AccI-H 断片を *Hph*I で消化した各断片を用いた結果 (詳細は省略) を考え合わせて、Fig. 5-B に示す構造と位置を決定した。その他にも 1 種 minor species が検出されたが、極めて量が少なく図示しなかった。

AccI-J 断片では 490 ヌクレオチドのバンドが 1 本だけ検出された。これは *Hind*III-G 断片で検出された 560 ヌクレオチドの RNA の一部に相当し、Fig. 5-B のように E1 B 領域の 5' 端側に位置づけられた。以上の他に

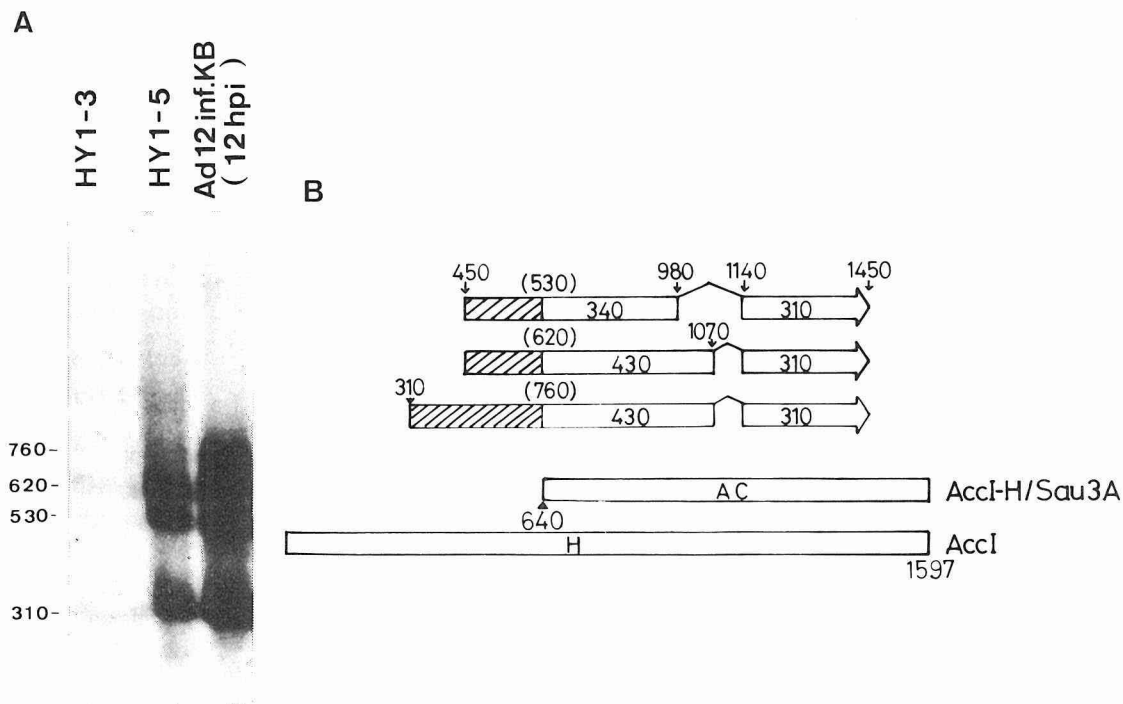


Fig. 6 Autoradiogram of nuclease S1-digested RNA-DNA hybrids of HY1-5 cytoplasmic RNA and diagrams of the deduced RNA structures. (A) Alkaline agarose gel of nuclease S1-digested HY1-5 RNA restriction fragment hybrids in parallel with those of HY1-3 and infected cells. Restriction fragments used are *Hind*III-G for HY1-5 and HY1-3 RNA and *Bam*HI-A²⁹ for infected cell RNA. (B) Diagrams of the structures of Ad12-specific RNAs in HY1-5 cytoplasm deduced from the data in (A) and those obtained with the AccI-H/*Sau*3A-AC fragment (data not shown). Representation is as in Fig. 4.

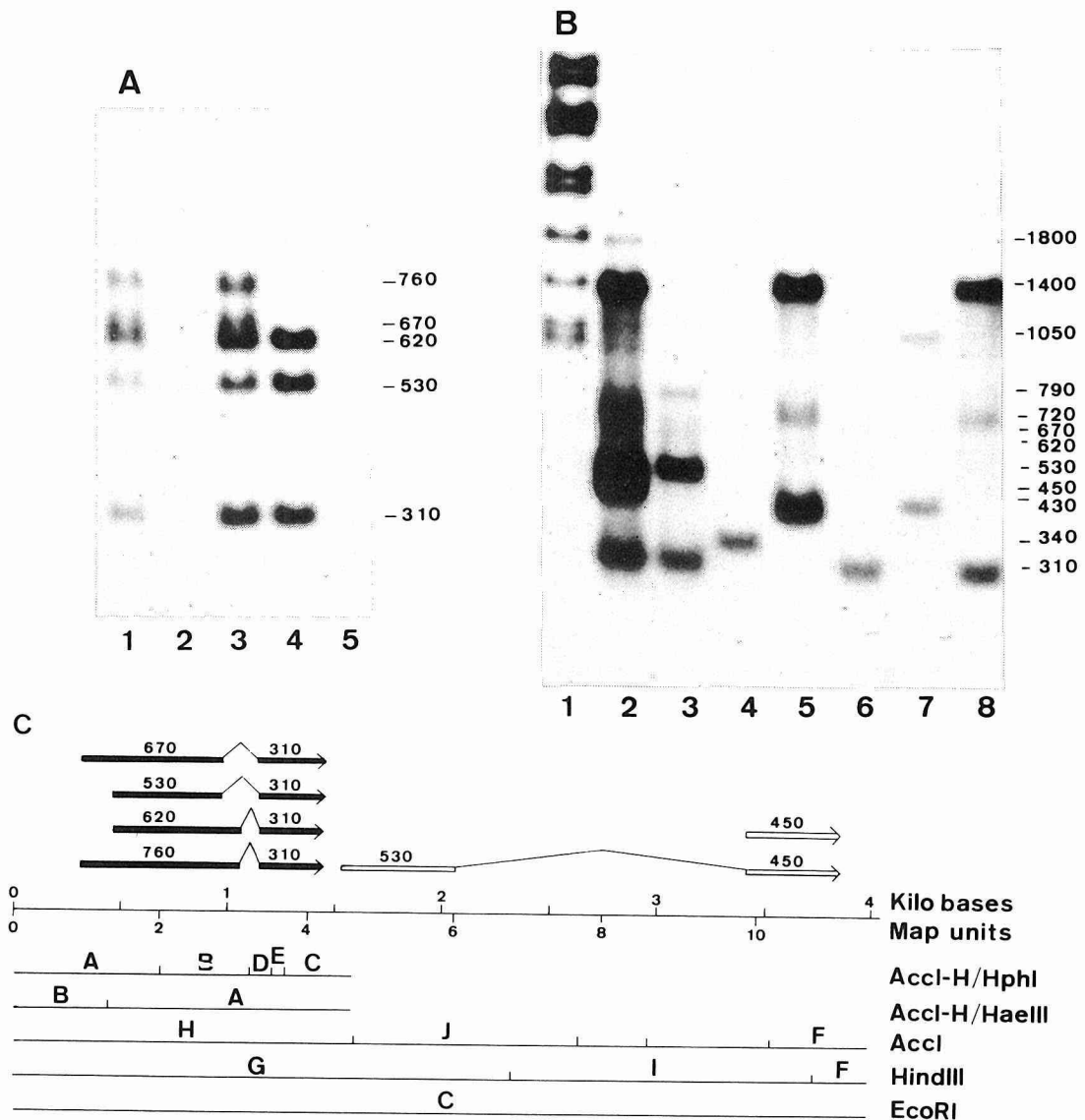


Fig. 7 Autoradiograms of nuclease S1-digested RNA-DNA hybrids of early region 1 cytoplasmic RNA in cells lytically infected with Ad12, and diagrams of the deduced RNA structures. (A) Alkaline agarose gel of nuclease S1-digested early RNA restriction fragment hybrids. Cytoplasmic RNA was prepared from human KBIII cells 8 h after lytic infection with Ad12. Restriction fragments used are *HindIII*-G (lane 1), *HindIII*-I (lane 2), *AccI*-H (lane 3), *AccI*-H/*HaeIII*-A (lane 4), and *AccI*-J (lane 5). (B) Alkaline agarose gel of nuclease S1-digested delayed early RNA restriction fragment hybrids. Cytoplasmic RNA was prepared from cells 23 h after lytic infection. Restriction fragments used are *EcoRI*-C (lane 2), *HindIII*-G (lane 3), *HindIII*-I (lane 4), *HindIII*-F (lane 5), *AccI*-H (lane 6), *AccI*-J (lane 7), and *AccI*-F (lane 8). Lane 1 is the *HindIII* marker digest of Ad12 DNA. (C) Diagrams of the deduced structures of early region 1 mRNA's in cells lytically infected with Ad12. The mRNA's detected at the early stage are represented by bold lines, and those detected only at the late stage are represented by open boxes. Representation is otherwise the same as in Fig. 4.

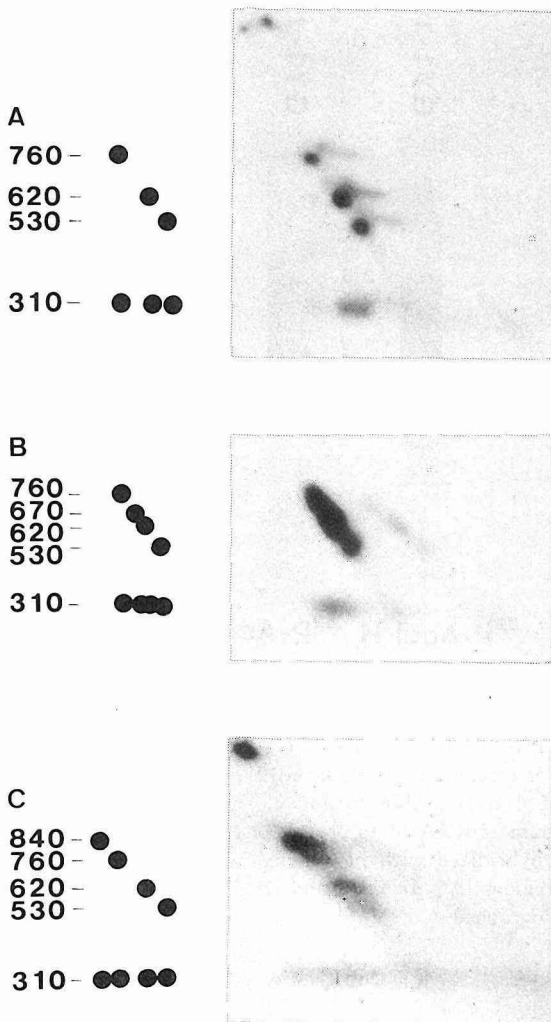


Fig. 8 Diagrams and autoradiograms of two-dimensional analysis of nuclease S1-digested RNA-DNA hybrids. The *AccI*-H fragment was hybridized with polyadenylic acid-containing cytoplasmic RNAs from CY1-1 cells (A), infected early cells (B), and GY1-1 cells (C). The first electrophoresis was from left to right in a neutral gel, and the second was from top to bottom in an alkaline gel. The numbers to the left of the dots represent the lengths of corresponding cotranscripts in nucleotides. Cotranscripts derived from a given mRNA species fall on the respective vertical line.

E1 A から E1 B に連続して転写された RNA も検出された (Fig. 5-B).

3.5 HY1-5 細胞のウイルス特異的 mRNA

HY1-5 細胞では *AccI*-H 断片によって 5 種の RNA が検出され (Fig. 6-A), このうち 3 種は *AccI*-H 断片を *Sau3A* で切断した断片を用いた結果 (Fig. 6-B) を合わせ, CY1-1, GY1-1 細胞の E1 A mRNA と共通であることが示された. 残りの minor species の位置と構造は調べなかった.

3.6 Ad12 感染ヒト KB III 細胞のウイルス特異的 mRNA

感染初期には *EcoRI*-C, *HindIII*-G, *AccI*-H 各断片で共通に 4 種の E1 A mRNA が検出された (Fig. 7-A). これらのうち 3 種は上記の各トランスフォーム細胞とも共通の mRNA であり, 残りの 1 種はその大きさと, *AccI*-H を *HaeIII* (Fig. 7-A) および *HphI* (詳細は省略) で切断した各断片を用いた結果とから, Fig. 7-C に示したようにその位置と構造を決定した. E1 B mRNA は感染初期には検出されなかった (Fig. 7-A).

感染後期には E1 A mRNA に加えて E1 B mRNA も見出された (Fig. 7-B). 一つは約 450 スクレオチドの大きさで E1 B 領域の右端に位置づけられるもので, ウイルス粒子構成蛋白 pIX をコードしていると考えられている. もう一つは E1 B 領域の左端の約 530 スクレオチドと右端の約 450 スクレオチドの部分から成るスプライス構造をもつ mRNA で, 各部分はそれぞれ *HindIII*-G で約 530 スクレオチド, *AccI*-J で約 460 スクレオチドおよび *HindIII*-I で約 340 スクレオチド, *AccI*-F で約 310 スクレオチドのバンドとして検出された (Fig. 7-B). *HindIII*-G および *AccI*-J 断片では更にもう 1 種の mRNA の一部分が検出され CY1-1 細胞の E1 B mRNA に対応するものと考えられたが, 全体の構造は決定できなかった.

3.7 E1 A mRNA のスプライス構造

AccI-H 断片を用いて CY1-1, GY1-1 および感染初期ヒト KBIII 細胞の E1 A mRNA のスプライス構造を 2 次元電気泳動法により解析した (Fig. 8). その結果, 先に検出した 3~4 種の E1 A mRNA のすべてに共通して 310 スクレオチドの部分が含まれることが示され, 前項までの解析が裏づけられた.

3.8 DBM paper blot hybrid 形成法による mRNA の解析

Ad12 感染初期ヒト KBIII 細胞, CY1-1 および GY1-1 細胞より抽出した mRNA を DBM paper に固定し, ^{32}P 標識した *AccI*-H (E1 A 領域) および *AccI*-

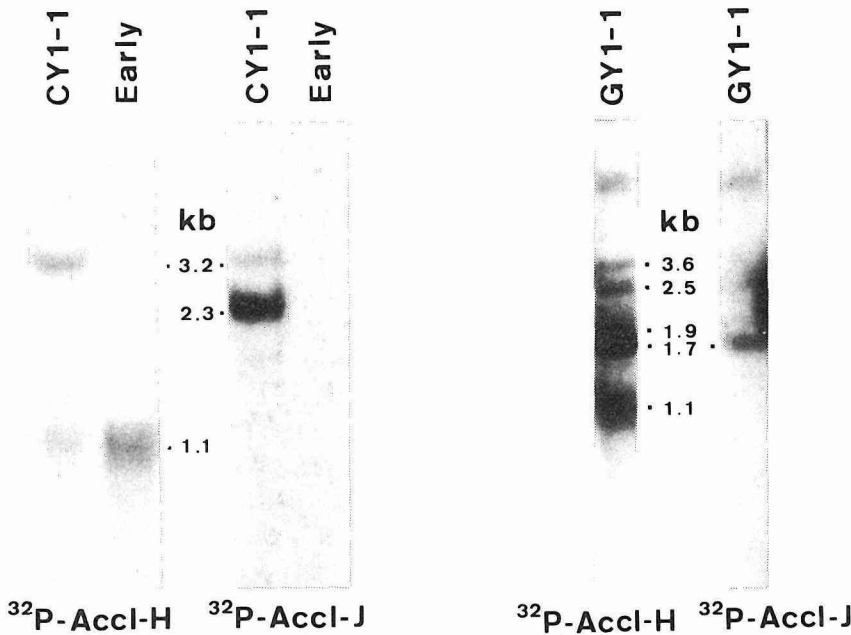


Fig. 9 DBM paper blot hybridization of mRNA's from CY1-1, GY1-1 and infected early cells. Polyadenylic acid-containing cytoplasmic RNA's were purified from CY1-1, GY1-1, and KB III cells early after lytic infection with Ad12 (in the presence of $20\mu\text{g}$ of $1-\beta\text{-D-arabinofuranosyl-cytosine}$ per ml of culture medium). RNA blots prepared as described in the text were hybridized with ^{32}P -labeled DNA probes specific to early regions 1A (*AccI*-H) and 1B (*AccI*-J) of Ad12 and autoradiographed.

J (E1 B 領域) 各断片と hybrid 形成させ、mRNA を検出した (Fig. 9). 感染初期ヒト KBIII 細胞では E1 A に約 1,100 スクレオチドの mRNA が検出され、他には検出されなかった。CY1-1 では E1 A の約 1,100 スクレオチド、E1 B の約 2,300 スクレオチドの mRNA の他に E1 A と E1 B に共通に約 3,200 スクレオチドの mRNA が検出された。GY1-1 では E1 A に約 1,100, 1,700, 1,900, 2,500, 3,600 スクレオチドの 5 種が検出され、E1 B には E1 A と共通の約 1,700 スクレオチドの mRNA が検出された。

4 考 察

本論文では、ヒトアデノウイルス 12 型 DNA 断片誘発トランスフォームラット細胞株 3 株および感染ヒト KB III 細胞中においてトランスフォーム能をもつ E1 領域から転写される mRNA を同定し、ウイルスゲノム上に位置づけた。その結果ヒトアデノウイルス 12 型の E1 領域の遺伝子の構成が明らかとなり、トランスフォー

ム細胞に特徴的な mRNA の存在も示された。これらの結果にもとづいて、最近決定された Ad 12 DNA の E1 領域の DNA 塩基配列^{17,18)} 上に RNA の転写とプロセッシングに関する特徴的な塩基配列を推定することができ、さらにコードされている蛋白の大きさと 1 次構造の推定も可能になった。

E1 A 領域には RNA 合成開始点が 2 カ所、スプライスが 2 種およびポリアデニル酸付加部位が 1 カ所見出され、感染細胞の 4 種および各トランスフォーム細胞に共通に認められた 3 種の mRNA はこれらの組み合わせで生じたものである。E1 B 領域には RNA 合成開始点が 2 カ所見出され、そのうち一つにはスプライス構造の異なる 2 種の mRNA が対応づけられた。このように Ad 12 の E1 A および E1 B 領域は、それぞれ互いに重複する複数種の mRNA を合成する複雑な遺伝子構造をもっていることが示された。

トランスフォーム細胞では、感染細胞で合成される 4 種の mRNA のうち 1 種が殆ど検出されなかった。こ

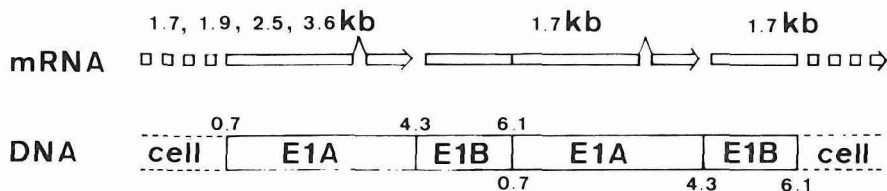


Fig. 10 Possible structures of unique mRNA's and their templates in GY1-1 cells. Arrows with sizes in kilobases represent possible structures of chimeric mRNA's unique to GY1-1 cells. At least two copies of a viral DNA fragment (leftmost 0.7-6.1% of viral DNA) should be integrated tandemly in cellular DNA.

の差の原因は明らかではないが、mRNA をプロセスする系がラット細胞とヒト細胞とで一部異なることを反映しているものと考えられる。また E1 B 遺伝子については、トランスフォーム細胞では容易に mRNA が検出されるのに比べ、感染初期にはその量が検出感度以下であった。これは Ad2¹⁴⁾ Ad5¹¹⁾ Ad7³¹⁾ の E1B mRNA が感染初期から容易に検出されることも合わせ、Ad12 の E1 B 遺伝子の発現が何らかの要因により強く制御されていることを示唆する。

GY1-1 細胞は E1 A 全体と E1B の左側の一部しか含まない *HindIII*-G 断片でトランスフォームした細胞で、E1 B 領域からは感染細胞や CY1-1 細胞にはみられない特徴的な RNA が 1 種のみ検出された。これは nuclease S1 mapping 法で約 560 スクレオチドのバンドとして検出されたもので、その 3'端は DNA 塩基配列上からもポリアデニル酸付加部位とは考えられない。DBM paper blot hybrid 形成法では約 600 スクレオチドの位置には mRNA が検出されず、約 1,700 スクレオチドの位置に検出された。従ってこの GY1-1 細胞の E1 B mRNA はその 3'側に E1 B 以外の塩基配列を含むと考えなければならない。同じ位置に検出される E1 A の約 1,700 スクレオチドの mRNA も E1 A 以外の塩基配列を含むと考えられるので、この約 1,700 スクレオチドの mRNA は 5'側に E1 B、3'側に E1 A の塩基配列をもつキメラ mRNA であると考えられる。このことは、GY1-1 細胞 DNA 中には、トランスフォーメーションに用いた *HindIII*-G 断片が同じ向きに直列に組み込まれ、かつ転写可能な部分が少なくとも 1 カ所存在することを示唆する (Fig. 10)。このようなキメラ mRNA の存在は Ad 7 DNA *HindIII*-I・J 断片でトランスフォームした細胞にも見だされており³¹⁾ これらの細胞中で発現される E1 B の遺伝情報は、キメラ mRNA に含まれる E1 B の左端部分の情報のみである。

その他に E1 A にのみ検出される約 1,900, 2,500, 3,600 スクレオチドの 3 種の mRNA がある (Fig. 9) が、これらは 5'側に細胞由来の塩基配列をもつものと考えられ (Fig. 10)、細胞 DNA 中へのウイルス DNA の組み込み部位を直接反映しているものであろう。

本研究の結果を Ad12 の E1 領域の DNA 塩基配列^{17,18)} に照らし合わせることで、各 mRNA に含まれる Ad12 由来の遺伝情報を推定できるようになった。それによると E1 A mRNA には 26 キロダルトンおよび 30 キロダルトンの蛋白がコードされており、E1 B mRNA にはウイルス粒子構成蛋白 pIX の他に 19 キロダルトン、54 キロダルトンおよび 8 キロダルトンの 3 種の蛋白がコードされている。このうち E1 B 遺伝子の一部分しかもたないが、完全なトランスフォーム細胞の表現型をもつ GY1-1 細胞において合成される E1B 蛋白は 19 キロダルトンの蛋白のみであるので、この蛋白が細胞の完全なトランスフォーメーションに重要な役割を果していると考えられる。この 19 キロダルトンの蛋白は最近ようやくその存在が確かめられ (斉藤, 白木, 下条: 未発表), 既に検出されている E1 A 蛋白^{32,33)} とともに、その機能を解明することがアデノウイルスによる発癌を理解する上で重要な課題となろう。

5 結 論

ヒトアデノウイルス 12 型 DNA の *EcoRI*-C 断片 (左端 16.2%), *HindIII*-G 断片 (左端 6.8%) および *AccI*-H 断片 (左端 4.7%) でそれぞれトランスフォームした 3 種のラット細胞株 CY1-1, GY1-1 および HY1-5 と、ヒトアデノウイルス 12 型感染ヒト KBIII 細胞において、トランスフォーム能をもつ初期領域 E1 から転写される mRNA を nuclease S1 mapping 法および DBM paper blot hybrid 形成法を用いて解析し、ゲノム DNA 上に位置づけた。

- 1) E1 領域では mRNA 合成の鋳型は DNA の r 鎖のみであった。
- 2) E1 A 領域では CY1-1, GY1-1, HY1-5 の各細胞に共通の 3 種の mRNA が見出され、感染細胞ではこれらを含む 4 種の mRNA が見出された。
- 3) E1 B 領域からは CY1-1, GY1-1 細胞でそれぞれ 1 種、感染後期細胞で 3 種の mRNA が見出されたが、感染初期細胞には検出されなかった。
- 4) GY1-1 細胞には CY1-1 および感染細胞に見られない特徴的な mRNA が見出された。これらはウイルス DNA の細胞 DNA への組み込み部位の構造を反映するキメラ mRNA と考えられた。
- 5) 不完全なトランスフォーム表現型を示す HY1-5 細胞にはすべての E1 A 遺伝情報が含まれているが、完全なトランスフォーメーションにはさらに E1 B 領域の左端部分の遺伝情報が必要であることが示された。最近決定されたヒトアデノウイルス 12 型の E1 領域の DNA 塩基配列をもとに、これらの部分にコードされている蛋白の大きさが推定された。

本研究の一部は、文部省がん特別研究II（藤永）および奨励研究A（澤田）の援助を受けた。

文 献

1. Green, M.: Oncogenic Viruses. Ann. Rev. Biochem. **39**, 701-756 (1970).
2. Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H., Yano, S., Ojima, S. and Fujinaga, K.: Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA. Virology **82**, 462-471 (1977).
3. Sekikawa, K., Shiroki, K., Shimojo, H., Ojima, S. and Fujinaga, K.: Transformation of rat cell line by an adenovirus 7 DNA fragment. Virology **88**, 1-7 (1978).
4. Graham, F. L., Abrahams, P. J., Mulder, C., Heijneker, H. L., Warnaar, S. O., de Vries, F. A. J., Fiers, W. and van der Eb, A. J.: Studies on *in vitro* transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **39**, 637-650 (1975).
5. Shiroki, K., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y. and Fujinaga, K.: Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA fragment. Virology **95**, 127-136 (1979).
6. Dijkema, R., Dekker, B. M. M., van der Feltz, M. J. M. and van der Eb, A. J.: Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. J. Virol. **32**, 943-950 (1979).
7. van der Eb, A. J., van Ormondt, H., Schrier, P. I., Lupker, J. H., Jochemsen, H., van der Elsen, P. J., DeLeys, R. J., Maat, J., van Beveren, C. P., Dijkema, R. and de Waard, A.: Structure and function of the transforming genes of human adenoviruses and SV40. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **44**, 389-399 (1980).
8. Sharp, P. A., Gallimore, P. H. and Flint, J. S.: Mapping of Ad2 RNA sequences in lytically infected cells and transformed cell lines. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **39**, 457-474 (1975).
9. Petterson, M., Tibbetts, C. and Philipson, L.: Hybridization maps of early and late mRNA sequences on the Ad2 genome. J. Mol. Biol. **101**, 479-501 (1976).
10. Wilson, M. C., Fraser, N. W. and Darnell, Jr., J. E.: Mapping of RNA initiation sites by high doses of uv irradiation: evidence for three independent promoters within the left 11% of the Ad2 genome. Virology **94**, 175-184 (1979).
11. Berk, A. J., Lee, F., Harrison, T., Williams, J. and Sharp, P.: Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. Cell **17**, 935-944 (1979).
12. Jones, N. and Shenk, T.: An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 3665-3669 (1979).
13. Berk, A. J. and Sharp, P. A.: Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. Cell **12**, 721-732 (1977).
14. Berk, A. J. and Sharp, P. A.: Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. Cell **14**, 695-711 (1978).
15. Chow, L. T., Broker, T. R. and Lewis, J. B.: Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. J. Mol. Biol. **134**, 265-303 (1979).
16. Sawada, Y. and Fujinaga, K.: Mapping of adenovirus 12 mRNA's transcribed from the transforming region. J. Virol. **36**, 639-651 (1980).
17. Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroki, K., Saito, I., Shimojo, H., Sawada, Y.,

- Uemizu, Y., Uesugi, S. and Fujinaga, K.: Structure and gene organization in the transforming *Hind*III-G fragment of Ad12. *Cell* **20**, 777-786 (1980).
18. Kimura, T., Sawada, Y., Shinagawa, M., Shimizu, Y., Shiroki, K., Shimojo, H., Sugisaki, H., Takanami, M., Uemizu, Y. and Fujinaga, K.: Nucleotide sequence of the transforming early region Elb of adenovirus type 12 DNA: structure and gene organization, and comparison with those of adenovirus type 5 DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6571-6589 (1981).
19. Yano, S., Ojima, S., Fujinaga, K., Shiroki, K., and Shimojo, H.: Transformation of a rat cell line by an adenovirus type 12 DNA fragment. *Virology* **82**, 214-220 (1977).
20. Green, M. and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology* **20**, 199-207 (1963).
21. Green, M. and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenoviruses and their DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 1251-1259 (1964).
22. Mackey, J. K., Brackmann, K. H., Green, M. R. and Green, M.: Preparation and characterization of highly radioactive *in vitro* labeled adenovirus DNA and DNA restriction fragments. *Biochemistry* **16**, 4478-4483 (1977).
23. Sawada, Y., Ojima, S., Shimojo, H., Shiroki, K. and Fujinaga, K.: Transforming DNA sequences in rat cells transformed by DNA fragments of highly oncogenic human adenovirus type 12. *J. Virol.* **32**, 379-385 (1979).
24. Zieve, G. and Penman, S. H.: Small RNA species of the HeLa cell; metabolism and subcellular localization. *Cell* **8**, 19-31 (1976).
25. Casey, J. and Davidson, N.: Rates of formation and thermal stabilities of RNA: DNA and DNA: DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acid Res.* **4**, 1539-1552 (1977).
26. Favaloro, J., Treisman, R. and Kamen, R.: Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: analysis by two-dimensional nuclease S1-gel mapping. *Methods Enzymol.* **65**, 718-749 (1980).
27. Alwine, J. C., Kemp, D. J. and Stark, G. R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5350-5354 (1977).
28. McMaster, G. K. and Carmichael, G. G.: Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4835-4838 (1977).
29. Sawada, Y., Honda, E., Yano, S. and Fujinaga, K.: Cleavage maps of highly oncogenic human adenovirus type 12 DNA with restriction endonucleases *Bam*HI, *Hind*III, *Sal*I and *Sma*I. *Tumor Res.* **15**, 35-43 (1980).
30. Kimura, T., Sawada, Y., Uesugi, S. and Fujinaga, K.: Cleavage maps of adenovirus type 12 transforming segment by restriction endonucleases *Acc*I, *Hae*III, *Hha*I, *Hind*II, *Hin*FI and *Hph*I. *Tumor Res.* **15**, 44-55 (1980).
31. Yoshida, K. and Fujinaga, K.: Unique species of mRNA from adenovirus type 7 early region 1 in cells transformed by adenovirus type 7 DNA fragment. *J. Virol.* **36**, 337-352 (1980).
32. Shiroki, K., Segawa, K. and Shimojo, H.: Two tumor antigens and their polypeptides in adenovirus type 12-infected and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2274-2278 (1980).
33. Segawa, K., Saito, I., Shiroki, K. and Shimojo, H.: *In vitro* translation of adenovirus type 12 specific mRNA complementary to the transforming gene. *Virology* **107**, 61-70 (1981).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学癌研究所分子生物学部門 澤田幸治